されるので、cystine 標準溶液のみを別に殺菌し、後に無菌的に添加して培養したが曲線の再現性がわるい。alanine は上記の菌については定量されず最近 *Leuc. citrovorum* を入手して之による定量法を目下検討している。

以上の如き検討を加えて作成せる標準曲線を示せば、Fig. 4 の如くである。使用菌株、定量範囲、定量培地の変更その他の条件を一括して Table 5 に示す。

本研究に対し終始御指導を賜つた坂口謹一郎先生並びに有馬啓先生、使用菌株を分与された米国 NRRL の Raper 博士及び御援助下さつた味ノ素株式会社、和光堂株式会社、三共製薬株式会社に対し深甚なる感謝の意を表する。なほ本研究費は文部省科学研究費によつたことを附記する。

(昭和 25 年 10 月日本農芸化学会東京支部例会にて講演)

(1) 従来のアミノ酸の微生物定量に関する参考文献は田村、桐村：『醸酵学の進歩』, Vol. 1, 94~164 (1950) (産業図書) 又は田村、有馬：『薬学』, Vol 4, No. 2, 110~142 (1950) (南山堂) を参照され度い。	305 (1943).
(2) HENDERSON, L. M. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 172, 15 (1948).	(8) HEGSTED, D. M. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 152, 193 (1944).
(3) DUNN, M. S. : <i>Physiol. Rev.</i> , 29, 219 (1949).	(9) KUIKEN K. A. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 151, 615 (1943).
(4) WOOLLEY <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 162, 383 (1946).	(10) DUNN, M. S. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 161, 657 (1945).
(5) HUTCHINGS, B. L. : <i>Proc. Soc. Exp. Biol., Med.</i> , 52, 36 (1943).	(11) DUNN M. S. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 156, 703 (1944).
(6) STOKES, J. L. : <i>Science</i> , 101, 43 (1945).	(12) GREENHUT J. T. SCHWEIGERT, B. S. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 162, 369 (1946).
(7) SHANKMAN, S. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 150,	(13) DUNN, M. S., SHANKMAN S. <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 168, 1 (1947).
	(14) LUCILE HAC <i>et al.</i> : <i>J. Biol. Chem.</i> , 159, 273 (1945).

Summary

1. The authors have examined the composition of the basal medium as well as its culture conditions for the microbiological determination of amino acids by lactic acid bacteria.
2. We have studied the amino acid requirement of *Lact. arabinosus*, *Lact. fermenti*, *Leuc. mesenteroides* and *Str. faecalis* in two different conditions ("heavy" and "light" inoculum).
3. We drew the standard curves for 17 kinds of amino acid improved the composition of basal medium and culture conditions, and determined its assay range.

高温性繊維素分解菌に関する研究 (第 3 報)

繊維素分解に対するリグニンの影響並びに実用的価値に就て

山田 浩一・藤本 義典・船田 譲 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 3 月 3 日 受理

Studies on the Thermophilic Cellulose-Decomposing Bacteria. Part 3. The Effect of Lignin on the Cellulose Decomposition and Some Aspects on the Practical Value of this Fermentation.

By Kōichi YAMADA, Yoshinori FUJIMOTO and Yuzuru FUNADA (Dept., Agr. Chem. Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

天然資源の活用という観点よりすれば、純繊維素を基質とした場合よりも、寧ろ木材や麦稈その他の含繊維素物質の分解能力及び生産物の検索の方が、より重要な意義があるわけであるが、この際最も障害となる点は、植物組織中では、繊維素部分が直接に露出しておらずに繊維素以外の物質、特にリグニンが組織に於て緊密に結びついている事である。PETERSON 等⁽¹⁾或は OLSON 等⁽²⁾は、パルプ及び材質の分解に於て、自然状態のリグニンは若干阻害作用を呈する事をみているが、一方 VIRTANEN 等⁽³⁾は材質中では繊維素とリグニンは化学的結合

によるよりも機械的に併存している故に、細粉して露出面を増せば分解度を増すと云い、又 STRAKER 等⁽⁴⁾ も麦桿について同様の結果を得てリグニンも若干分解され得ると報じている。我々はこの点に関して若干の検討を加え、リグニンそのものの影響よりも、組織中の繊維素の結合状態が分解力に関係する事を認めたのでここに報告する。

実 験 の 部

I. 木粉の分解 針葉樹として杉 (*Cryptomeria japonica*), 檜 (*Chamaecyparis obtusa*), 唐松 (*Larix kaempferi*) を、闊葉樹として山毛櫸 (*Fagus crenata*) を用い之等の木質部を ball mill にかけて磨砕及び細

Table 1. Each Fraction of Splinter Manufactured by a Ball Mill

mesh/inch	C. <i>japonica</i>	Ch. <i>obtusa</i>	L. <i>kaempferi</i>	F. <i>crenata</i>
20~40	43.10	44.77	32.80	24.80
40~50	26.35	27.00	24.65	27.60
50~100	24.87	21.97	33.40	35.44
100~150	2.50	3.21	3.40	5.10
150~	3.18	3.05	5.75	7.06

粉し, inch mesh により篩別した。その各部分は Table 1 に示す。試料としては 40~50 mesh/inch の部分を選び、更に之を細粉して 100~150 mesh/inch にして用い、この他、赤松、とど松の ground pulp を細粉したものをも使用した。試料は全て風乾したものをを用い、別に 105° にて恒量に至らしめて試料の重量とした。培養液は全て前報⁽⁵⁾と同組成のものを使用

し、500 cc 三角フラスコに各試料 1% の培養基を 300 cc 宛注加して種菌を 1 cc 接種した。30日間培養を続けたが分解の徴候は全くみられず、唯液中に生育した混在菌の混濁を認めた。培養後ガラス濾過器 G 3 で濾過し温水で洗滌後初めと同じく 105° に乾燥、秤量すると約 3~8% の減少を示した。併し、各試料の無接種のものも同程度の減少を示して相当量の温水可溶性成分の溶出があつた事を示し、又各について両者を比較すると、その差は何れも実験誤差の範囲となり、従つて分解は殆んど行われなかつたと見做される。

II. 脱リグニン処理を施せる材質の分解 試料として檜を用い、前と同様 40~50 mesh/inch の部分を選んで脱リグニン処理を施し、無処理のものは更に細粉して 100~150 mesh/inch にして使用した。脱リグニンは塩素法により、西田等の装置⁽⁶⁾に従つて行つた。即ち試料をガラス濾過器 G 3 に採つて湿し、之を DORE による塩素反応濾過床に装備し、ガス溜槽から塩素ガス 400 cc を 10 分間通じてリグニンを塩化リグニンと化し次いで 1% 冷亜硫酸水 (2~3回)、及び冷水を以て洗滌し、更に試料を 3% 亜硫酸ソーダ液に浸して湯煎中に 1 時間加熱後、吸引濾過により亜硫酸ソーダ中に溶解した塩化リグニンを除去し、温水及び冷水で洗滌して塩素及び硫酸の反応を示さなくなつたものを培養に用いた。かくして得た各試料について組成を調べたが、その分析方法

Table 2. Decomposition of Delignified Wood by Cellulose-fermenter

Delignification		Not treated	Chlorinated					
			1 time	2 times	3 times	4 times		
Composition %	{ Cellulose	53.23	80.61	88.31	94.06	100		
	{ Pentosane	8.99	13.21	8.50	4.63	0		
	{ Lignin	30.56	1.78	0.88	±	0		
	{ Others	7.22	4.50	2.31	1.3	0		
Inoculation		Not treated 30	Inoculated					
Incubation time (days)			30	8	8	8	8	
Residual	{ Decomposed %	{ G 1	8.2	7.9	98.5	99.0	99.0	98.9
		{ G 3	—	—	95.2	97.1	97.2	97.2
	{ Composition %	{ Cellulose	54.05	53.80	±	±	±	±
		{ Pentosane	9.21	9.11	±	0	0	0
		{ Lignin	31.54	31.66	±	±	0	0
		{ The others	5.20	5.43	—	—	—	—
Products	{ Quantitat. (based on wood decomposed)	{ Alcohol	—	0	0.5	3.1	0.3	0
		{ Total acid	—	0	34.4	31.2	29.7	25.0
		{ Vol. acid	—	0	15.2	18.3	13.5	10.7
		{ Unvol. acid	—	0	19.2	12.9	16.2	14.3
		{ Ethanol	—	—	±	±	±	—
	{ Qualitative	{ Butanol	—	—	—	—	—	—
		{ Formic acid	—	—	—	—	—	—
		{ Acetic acid	—	—	+	+	+	+
		{ Butyric acid	—	—	+	+	+	+
		{ Lactic acid	—	—	+	+	+	+
	Carbon recovery*%		—	0	31.2	28.1	26.3	21.9

* Based on cellulose and pentosane decomposed.

は全て西田の標準分析法⁽⁷⁾に従った。即ちアルコール・ベンゼン等量混合液にてソックスレー浸出器で 20 時間抽出後のものについて繊維素、ペントザン、リグニンの定量を行つた。塩素化を 3 回施したものはリグニンの呈色反応を示したが定量を行うには至らず、又 4 回行つたものは殆んど純繊維素であつた。

培養には各試料を 1% 添加し、培養液 300 cc に対し、無処理のものは種菌を 10 cc、脱リグニン処理せるものは 5 cc 接種した。無処理のものは前実験と同様に分解は起らず、又何ら生産物も検出されなかつたが、脱リグニン処理せるものは極めて分解が良好であつた。その結果は Table 2 の如くである。

試料は全てガラス濾過器 G 1 に濾過されないものを用いたが、醗酵残渣は G 1 で濾過後も猶若干の固形分を残したので更に G 3 にて濾過し、そのものについて残物及び生産物の分析を行つた。脱リグニン処理を施したものは何れも分解率は 95% 以上にも及び、前報に取扱つた濾紙を繊維素源として培養したものより寧ろ良好な結果を示した。当実験では繊維素のみならず、ペントザンも極めて良く分解されるという結論を得たが、又組織が全く破壊されて原形の片鱗さえ留めていない試料では、約 2% のリグニンが存在しても殆んど醗酵の妨げとならないとの結果をも得た。

分解生産物は、試料中のペントザンが増すにつれて炭素回収率及び生産された酸の割合がやや漸増したが、揮発酸と不揮発酸の比率は不定で、揮発酸は 11~18%, 不揮発酸は 13~19% の収量を得た。他の生産物も濾紙を使つた場合と大略同じものであつたが、アルコール類の生産が非常に少く、ブタノールは勿論の事、エタノールさえ検出し得ない培養が相当数見出された。分解率が極めて高い場合にはアルコール収量が寧ろ低下する現象は繊維素醗酵でしばしばみるところであるが、ガス以外の生産物の炭素回収率の低い事と相俟つて、生産物を目的とする場合はその利用価値は余り良好でないと思われる。

III. 単離リグニンの分解に及ぼす影響 リグニンの影響に関しては繊維素培養基にリグニンを添加するか、若しくは木材腐朽菌により或る程度破壊された組織を用いる事により検討した。OLSON 等⁽²⁾は化学的に単離したリグニンは自然状態にあるリグニンと余程様相が異なるが、少くとも繊維素の分解には影響はないとみているので、この点に関し検討を行つた。材質より溶出法によつて得たリグニンは往々にして分子量の小さい化合物であるので、リグニン以外の木材質を溶解し去る方法により試料を得た。それ故、収率が良好で、比較的高分子の儘に得られ、且つ炭水化物の含量を無視し得る利点を有する点で、硫酸リグニン及び塩酸リグニン等の酸リグニンを使用した。試料は杉を摩砕して得た 50~100 mesh/inch のものを用い、水を加えて 3 時間煮沸して温水可溶部を除き、よく乾燥した後、酸処理を行つた。硫酸リグニンは試料 2 g に対し、72% 硫酸を 50 cc 加えて 5° に 32 時間放置し、次いで水を 500 cc 添加して沸騰する迄加熱して濾過洗滌して得た。又塩酸リグニンは八浜の方法⁽⁸⁾に従つてアルコール・ベンゼン抽出を施した試料について塩酸処理後、稀硫酸にて煮沸し、濾過洗滌して得た。之等のものはその中に SO₃ 或は Cl が強く吸着或は結合していて醗酵試験にはリグニンそのものよりも著しい影響を与えるので、洗滌には特に意を用いた。塩酸リグニンは 1 g に対し水 400 cc 加えて 3 時間宛 Cl⁻ 反応が消失する迄煮沸、洗滌し、猶 9 回この操作を繰返した。かくして得たものは両者とも更に水を 500 cc 加えて 60° に 1 カ月おき、洗滌したものを用いた。

培養は全て前述の如くに行い、繊維素量は 1% とし、之に単離したリグニンをそれぞれ 0.25% 添加して 15 日培養を行つた。

醗酵は何れも旺盛で、繊維素の分解率は概ね 90% であつたが、リグニンは殆んど分解されなかつた。得た結果は Table 3 に示す。リグニンを添加せるものに於ける繊維素分解率は無添加のものと殆んど変わらず、又実験例中には反つて分解率の良好なものがあり、従つて単離リグニンは概して繊維素分解には影響はないと認められた。

IV. 半腐朽材質の分解 細粉せる材質が繊維素分解菌に侵されない事、並びに単離せるリグニンが殆んど分解に影響を及ぼさない事より、材質の分解を妨げる要因として、1) 組織中では繊維素がリグニンその他のものと緊密に結合して菌の侵入を許さない事、2) 試料の粉碎度が低いため繊維素部分の露出部が少ない事、3) 木材中の特殊成分中に阻害物質が存在する事等が考えられよう。特殊成分はその種類は甚だ多く、それ等についての細い検討は非常に困難である。併し、その大部分はエーテル、ベンゼン、アルコール及び温水に溶出すると思われるので、材質を之等の溶剤で抽出すれば、少くとも特殊成分の影響を最小限に留め得ると考えられ

る。そこでこの目的のために、前実験と同じようにして得た木粉を、常法に従つて抽出操作を施し、このものを試料として培養を試みたが何ら分解を示さなかつた。従つて阻害作用は主に 1), 2) の原因によると考えられる。脱リグニン処理を施して組織を全く破壊してホロ繊維素を化学的にも、亦物理的にも単離状態においた場合には前実験に得た結果の如く、約 2% のリグニン存在下でも極めて良好な分解を示した。それで、半ば組織を破壊された試料を得る為に、他の微生物、特に木材腐朽菌により腐植した材質を用いて実験を行つた。

繊維素の比較的多く残存する白色朽の試料としては、森林中の栗 (*Castanea crenata*) の倒木で、質が脆弱となつて海綿状を呈しているもの (菌種不明) 及び *Daedalea* 属の菌に犯されたナラの白色朽を用い、又リグニンの比較的多く残存する褐色朽の試料としては、*Faria* 属の菌に犯されて亀裂性を示す檜の倒木、及び *Merulius* 属の菌に犯された杉材を用いた。之等のものは何れも指圧によつて剝奪し得る程度に腐朽しており、顕微鏡下でも生木に比して組織がかなり破壊されている。試料は先ず ball mill にかけて磨碎し、100~150 mesh/inch のものを採つて熱水で数回洗滌し、更に 60° で 1 カ月放置して温水可溶分を除き、1% 含量にして 15 日培養を行つた。栗及び檜について得た結果は Table 3 の如くであるが、他のものの結果もほぼ同様である。即ちこの場

Table 3. Effect of Lignin for Cellulose Fermentation and Lignin Degradation.

	1 % Cellulose	1% cellulose + 0.25% H ₂ SO ₄ lignin	1% cellulose + 0.25% HCl lignin	white rots	Brown rots
Composition %					
Cellulose	100	80	80	60.5	13.8
Pentosan	—	—	—	9.6	8.3
Lignin	—	20	20	18.3	61.2
Decomposed %					
Cellulose	92.1	89.8	91.5	3.3	0
Lignin	—	0	0.3	0.1	0.2

合にあつても分解が殆んど起らず、肉眼的にもその徴候はみられなかつた。白色朽のものは繊維素に若干の減少を示すものもあつたが実験例中には変化のないものもあり、その結果はやや疑わしい。リグニンはその分解率が実験誤差の範囲に入り、恐らく分解されなかつたとみられる。

以上の事より、自然状態に於ては、材質が木材腐朽菌により半ば組織が破壊したとしても、短時日には繊維素分解菌に侵される事はなく、少くとも組織が完全に破壊されてホロ繊維素が化学的にも、亦物理的にも単離状態に至らないと細菌の作用が行われないと推論された。然して高温性繊維素分解菌は、繊維素及びペントザン分解酵素を有してはいるが、リグニン分解酵素に欠けており、又木材腐朽菌と異つて植物の組織を破壊するに必要な酵素系をも所有していないと推断された。

なお本研究は文部省科学研究費により行われた
終りに臨み御指導を賜つた朝井教授に深謝す。

(1) W. H. PETERSON and S. SNIESZKO :
<i>Zentr. Bakt.</i> , II, 88, 410 (1933).	(4) R. P. STRAKA, G. H. NELSON and M.
LEVINE : <i>J. Agr. Res.</i> , 1, 3 (1942).
(2) E. R. OLSON, W. H. PETERSON and E.
G. SHERRARD : <i>Ind. Eng. Chem.</i> , 29,
1026 (1937).	(5) 山田, 藤本, 船田 : 農化,
(3) A. I. VIRTANEN : <i>Nature</i> , 158, 795
(1946).	(6) 西田, 深水, 羽島 : 繊維素工業, 11, 60 (1935).
	(7) 西田 : 木材化学工業, 上, 468 (1946).
	(8) 八浜, 上代 : リグニンの化学, 117 (1946).

Summary

For the purpose of utilizing the cellulose digestion on an industrial scale, decomposition products of various kinds of woods and the effect of lignin on the fermentation were investigated. In spite of powerful attack to cellulose or pentosan, cellulose thermophile could not digest lignin isolated chemically by which the fermentation was not effected.

The main interest from the industrial aspect had been in the obtaining of alcohol. Delignified woods were fermented up to 97% producing 25~34% organic acid, although ball-milled woods and ground pulp were not decomposed. But the production of alcohol and recovery of carbon were too poor to be applied on an industrial scale.

In nature, cellulose thermophile could not attack the tissue decayed by fungi or the ball-milled tissue, so it was considered that cellulose bacteria had no such enzymic action on woods as was shown by wood-destroying fungi.